



DCM014-12
Ed. 01/2015

b-HCG ELISA

per analisi di routine

Determinazione immunoenzimatica diretta della s-HCG nel siero o plasma umano.

IVD



LOT

vedere etichetta esterna



$\Sigma = 96$ test

REF DKO014

DESTINAZIONE D'USO

Metodo immunoenzimatico colorimetrico per la determinazione quantitativa della concentrazione della β -HCG nel siero o plasma umano.

Il kit b-HCG ELISA è destinato al solo uso di laboratorio.

1. SIGNIFICATO CLINICO

L'HCG è un ormone glicoproteico secreto in gravidanza, è sintetizzato dall'embrione subito dopo il concepimento e successivamente dalla placenta. Il ruolo è di impedire la disintegrazione del corpus luteum dell'ovaia e quindi di favorire la sintesi di progesterone che è una condizione critica per la gravidanza negli esseri umani. L'HCG ha ulteriori funzioni, ad esempio è coinvolto nell'immuno-tolleranza della gravidanza.

La verifica, durante la gravidanza, dei livelli di HCG nel sangue o nell'urina indica la presenza o l'assenza di un embrione impiantato. In particolare, i test di gravidanza impiegano un anticorpo che è specifico per l'unità di HCG (-HCG). Ciò è importante in modo che le prove non generino falsi positivi con LH e FSH.

Il -HCG è secreto da alcune cellule cancerose come ad esempio il teratoma e il coriocarcinoma. Ma, livelli elevati non possono dimostrare la presenza di un tumore e livelli bassi non lo escludono.

2. PRINCIPIO DEL METODO

Il test Diametra ELISA per la β -HCG è basato sulla cattura simultanea della HCG da parte di un anticorpo monoclonale diretto contro la frazione β -HCG immobilizzato sulla micropiastra e di un altro anticorpo monoclonale diretto contro la frazione α -HCG coniugato con la perossidasi di rafano (HRP).

Dopo un determinato periodo di incubazione, la separazione libero-legato si ottiene mediante semplice lavaggio della fase solida. L'enzima HRP presente nella frazione legata, catalizza la reazione tra il Substrato (H_2O_2) ed il TMB Substrate, sviluppando una colorazione blu che vira al giallo dopo aggiunta dello Stop solution (H_2SO_4). L'intensità del colore sviluppato è proporzionale alla concentrazione di β -HCG presente nel campione.

La concentrazione dell' β -HCG nel campione è calcolata in base ad una curva di calibrazione.

3. REATTIVI, MATERIALI E STRUMENTAZIONE

3.1. Reattivi e materiali forniti nel kit

1. Calibrators (6 flaconi, 1 mL ciascuno)

CAL0	REF DCE002/1406-0
CAL1	REF DCE002/1407-0
CAL2	REF DCE002/1408-0
CAL3	REF DCE002/1409-0
CAL4	REF DCE002/1410-0
CAL5	REF DCE002/1411-0

2. Control (1 flacone, 1 mL)

La concentrazione del Controllo è indicata sul Certificato di Analisi

REF DCE045/1403-0

3. Incubation Buffer (1 flacone, 50 mL)

Phosphate buffer 50 mM pH 7.4, BSA 1 g/L

REF DCE001/1401-0

4. Conjugate (1 flacone, 1 mL)

Anticorpo monoclonale coniugato a perossidasi di rafano (HRP) diretto contro la subunità α -HCG

REF DCE002/1402-0

5. Coated Microplate (1 micropiastra breakable)

Anticorpo monoclonale adsorbito sulla micropiastra diretto contro la subunità β -HCG

REF DCE002/1403-0

6. TMB Substrate (1 flacone, 15 mL)

H_2O_2 -TMB (0,26 g/L) (evitare il contatto con la pelle)

REF DCE004-0

7. Stop Solution (1 flacone, 15 mL)

Acido Solforico 0,15 mol/L (evitare il contatto con la pelle)

REF DCE005-0

8. 50X Conc. Wash Solution (1 flacone, 20 mL)

NaCl 45 g/L, Tween-20 55 g/L

REF DCE006-0

3.2. Reattivi necessari non forniti nel kit

Acqua distillata.

3.3. Materiale e strumentazione ausiliare

Dispensatori automatici.

Letture per micropiastre (450 nm, 620-630 nm)

Note

Conservare tutti i reattivi a 2-8°C, al riparo dalla luce.

Aprire la busta del Reattivo 5 (Coated Microplate) solo dopo averla riportata a temperatura ambiente e chiuderla subito dopo il prelievo delle strip da utilizzare; una volta aperta è stabile fino alla data di scadenza del kit. Evitare di staccare la sheet adesiva dalle strip che non vengono utilizzate nella seduta analitica.

4. AVVERTENZE

- Questo test kit è per uso in vitro, da eseguire da parte di personale esperto. Non per uso interno o esterno su esseri Umani o Animali.
- Usare i previsti dispositivi di protezione individuale mentre si lavora con i reagenti forniti.
- Seguire le Buone Pratiche di Laboratorio (GLP) per la manipolazione di prodotti derivati da sangue.
- Alcuni reagenti contengono piccole quantità di Proclin 300^R come conservante. Evitare il contatto con la pelle e le mucose.
- Il TMB Substrato contiene un irritante, che può essere dannoso se inalato, ingerito o assorbito attraverso la cute. Per prevenire lesioni, evitare l'inalazione, l'ingestione o il contatto con la cute e con gli occhi.
- La Stop Solution è costituita da una soluzione di acido solforico diluito. L'acido solforico è velenoso e corrosivo e può essere tossico se ingerito. Per prevenire possibili ustioni chimiche, evitare il contatto con la cute e con gli occhi.
- Evitare l'esposizione del reagente TMB/H₂O₂ a luce solare diretta, metalli o ossidanti. Non congelare la soluzione.
- Questo metodo consente di determinare concentrazioni di β-HCG da 1 mIU/mL a 400 mIU/mL.

5. PRECAUZIONI

- Si prega di attenersi rigorosamente alla sequenza dei passaggi indicata in questo protocollo. I risultati presentati qui sono stati ottenuti usando specifici reagenti elencati in queste Istruzioni per l'Uso.
- Tutti i reattivi devono essere conservati a temperatura controllata di 2-8°C nei loro contenitori originali. Eventuali eccezioni sono chiaramente indicate. I reagenti sono stabili fino alla data di scadenza se conservati e trattati seguendo le istruzioni fornite.
- Prima dell'uso lasciare tutti i componenti dei kit e i campioni a temperatura ambiente (22-28°C) e mescolare accuratamente.
- Non scambiare componenti dei kit di lotti diversi. Devono essere osservate le date di scadenza riportate sulle etichette della scatola e di tutte le fiale. Non utilizzare componenti oltre la data di scadenza.
- Qualora si utilizzi strumentazione automatica, è responsabilità dell'utilizzatore assicurarsi che il kit sia stato opportunamente validato.

- Un lavaggio incompleto o non accurato dei pozzetti può causare una scarsa precisione e/o un'elevato background. Per migliorare le prestazioni del kit su strumentazione automatica, si consiglia di aumentare il numero di lavaggi.
- Per la riproducibilità dei risultati, è importante che il tempo di reazione di ogni pozzetto sia lo stesso. Per evitare il time shifting durante la dispensazione degli reagenti, il tempo di dispensazione dei pozzetti non dovrebbe estendersi oltre i 10 minuti. Se si protrae oltre, si raccomanda di seguire lo stesso ordine di dispensazione. Se si utilizza più di una piastra, si raccomanda di ripetere la curva di calibrazione in ogni piastra.
- L'aggiunta del TMB Substrato dà inizio ad una reazione cinetica, la quale termina con l'aggiunta della Stop Solution. L'aggiunta del TMB Substrato e della Stop Solution deve avvenire nella stessa sequenza per evitare tempi di reazione differenti.
- Osservare le linee guida per l'esecuzione del controllo di qualità nei laboratori clinici testando controlli e/o pool di sieri.
- Osservare la massima precisione nella ricostituzione e dispensazione dei reagenti.
- Non usare campioni microbiologicamente contaminati, altamente lipemici o emolizzati.
- I lettori di micropiastre leggono l'assorbanza verticalmente. Non toccare il fondo dei pozzetti.

6. PROCEDIMENTO

6.1. Preparazione dei Calibratori (C₀...C₅)

I Calibratori sono pronti all'uso, sono calibrati contro il WHO 1st IRP 75/537 ed hanno le seguenti concentrazioni:

	C ₀	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅
mIU/mL	0	1	5	20	100	400

I Calibratori sono stabili fino alla data di scadenza riportata in etichetta. Una volta aperti i Calibratori sono stabili per almeno 6 mesi a 2-8°C.

6.2. Preparazione della Wash Solution

Prima dell'uso, diluire il contenuto di ogni fiala di "50X Conc. Wash Solution" con acqua distillata fino al volume di 1000 mL. Per preparare volumi minori rispettare il rapporto di diluizione di 1:50. La soluzione di lavaggio diluita è stabile a 2-8°C per almeno 30 giorni.

6.3. Preparazione del Coniugato Diluito

Preparare immediatamente prima dell'uso. Aggiungere 10 µL di Conjugate (reattivo 4) a 1 mL di Incubation Buffer (reattivo 3). La quantità di coniugato da preparare è proporzionale al numero dei test. Mescolare delicatamente lasciando almeno 10 minuti su agitatore rotante. Stabile per almeno 3 ore a temperatura ambiente (22-28°C).

6.4. Preparazione del campione

La determinazione della β -HCG si effettua su siero o plasma umano. Se il dosaggio non viene effettuato entro due giorni dal prelievo conservare il campione a -20°C . Evitare cicli di congelamento e scongelamento.

Per campioni con concentrazione superiore a 400 mIU/mL diluire il campione con Incubation buffer.

Il Controllo è pronto all'uso.

6.5. Procedimento

- **Portare tutti i reagenti a temperatura ambiente ($22-28^{\circ}\text{C}$) per almeno 30 minuti.** Al termine del dosaggio riporre immediatamente tutti i reagenti a $2-8^{\circ}\text{C}$: evitare lunghi periodi a temperatura ambiente.
- Le strisce di pozzetti non utilizzate devono essere rimesse immediatamente nella busta richiudibile contenente il materiale essiccante e conservate a $2-8^{\circ}\text{C}$.
- Per evitare potenziali contaminazioni microbiche e/o chimiche non rimettere i reagenti inutilizzati nei flaconi originali.
- Al fine di aumentare l'accuratezza dei risultati del test è necessario operare in doppio, allestendo due pozzetti per ogni punto della curva di calibrazione (C_0-C_5), due per ogni Controllo, due per ogni Campione ed uno per il Bianco.

7. CONTROLLO QUALITA'

Ogni laboratorio dovrebbe analizzare i campioni nella gamma dei livelli elevati, normali e bassi di β -HCG per il controllo delle prestazioni dell'analisi. Questi campioni dovrebbero essere trattati come ignoti ed i valori determinati in ogni test effettuato. Le tabelle di controllo qualità dovrebbero essere effettuate per seguire le prestazioni dei reagenti forniti. Metodi statistici adeguati dovrebbero essere impiegati per accertare il trend. Il laboratorio dovrebbe fissare i limiti di accettabilità di prestazioni dell'analisi. In più, la capacità di assorbimento massima dovrebbe essere costante con l'esperienza precedente. La deviazione significativa dalle prestazioni stabilite può indicare il cambiamento inosservato negli stati o nella degradazione sperimentali dei reagenti del kit. Reagenti freschi dovrebbero essere usati per determinare il motivo delle variazioni.

8. RISULTATI

8.1. Estinzione Media

Calcolare l'estinzione media (E_m) di ciascun punto della curva di calibrazione (C_0-C_5) e di ogni campione.

8.2. Curva di calibrazione

Tracciare il grafico dell'assorbanza (E_m) in funzione delle concentrazioni dei Calibratori (C_0-C_5) (es: Four Parameter Logistic o Sigmoide).

8.3. Calcolo dei risultati

Interpolare, dal grafico, i valori di assorbanza relativi a ciascun campione e leggerne la corrispondente concentrazione in mIU/mL.

9. VALORI DI RIFERIMENTO

Ogni laboratorio dovrebbe stabilire il proprio range basandosi sulla propria popolazione di pazienti.

I valori sierici di β -HCG sono compresi nei seguenti intervalli:

	Range (mIU/mL)
Donne normali	< 8.0
Gravidanza:	
1° settimana	3.0 - 100
2° settimana	10 - 1000
3° settimana	100 - 10000
4° settimana	1000 - 100000
2° mese	15000 - 200000
3° mese	10000 - 100000

È importante tenere presente che la determinazione di un range di valori attesi in un dato metodo per una popolazione "normale" è dipendente da molteplici fattori, quali la specificità e sensibilità del metodo in uso, e la popolazione in esame. Perciò ogni laboratorio dovrebbe considerare i range indicati dal Fabbricante come un'indicazione generale e produrre range di valori attesi propri basati sulla popolazione indigena dove il laboratorio risiede.

Reagente	Calibratore	Campione /Controllo	Bianco
Calibratore C_0-C_5	25 μL		
Campione /Controllo		25 μL	
Coniugato Diluito	100 μL	100 μL	
Incubare 1 h a temperatura ambiente ($22\pm 28^{\circ}\text{C}$). Allontanare la miscela di reazione; lavare i pozzetti per 3 volte con 0,3 mL di Wash Solution diluita Nota importante: ad ogni step di lavaggio, agitare delicatamente la piastra per 5 secondi e successivamente rimuovere l'eccesso di soluzione di lavaggio sbattendo delicatamente la micropiastra capovolta su fogli di carta assorbente. Lavaggi automatici: se si utilizza strumentazione automatica effettuare almeno 5 lavaggi.			
TMB Substrate	100 μL	100 μL	100 μL
Incubare 15 minuti a temperatura ambiente ($22\pm 28^{\circ}\text{C}$), al riparo dalla luce..			
Stop Solution	100 μL	100 μL	100 μL
Agitare delicatamente la micropiastra. Leggere l'assorbanza (E) a 450 nm contro una lunghezza d'onda di riferimento di 620-630 nm oppure contro il Bianco entro 5 minuti.			

10. PARAMETRI CARATTERISTICI

10.1. Precisione

10.1.1. Intra-Assay

La variabilità all'interno dello stesso kit è stata determinata replicando (16x) la misura di tre differenti sieri di controllo. La variabilità intra-assay è 7,6%.

10.1.2. Inter-Assay

La variabilità tra kit differenti è stata determinata replicando la misura di tre differenti sieri di controllo con kit appartenenti a lotti diversi. La variabilità inter-assay è 8,8%.

10.2. Accuratezza

La prova di recupero condotta su un campione arricchito con 6,25 - 12,5 - 25 - 50 mIU/mL di β -HCG ha dato un valore medio (\pm SD) di 99,2% \pm 4,1%.

10.3. Specificità

La cross-reattività del kit -HCG ELISA è stata calcolata sulla base dei rapporti di massa:

β -HCG	100%
hFSH	3,0%
HCG	4,0%
hTSH	0,02%

10.4. Sensibilità

La concentrazione minima di β -HCG misurabile che può essere distinta dal Calibratore 0 è 0,09 mIU/mL con un limite di confidenza del 95%.

10.5. Correlazione

Il kit Diametra β -HCG ELISA (y) è stato comparato con un kit disponibile in commercio (x). Sono stati testati i campioni di siero di 49 donne.

La curva di regressione è :

$$y = 0,94 x - 0,02$$

$$r = 0,96 \quad (r^2 = 0,92)$$

10.6. Effetto "Hook"

In questo metodo non è stato osservato effetto Hook fino a 250.000 mIU/mL.

11. DISPOSIZIONI PER LO SMALTIMENTO

I reagenti devono essere smaltiti in accordo con le leggi locali.

BIBLIOGRAFIA

1. Wisdom, G.B. Clin. Chem. 22/8 1243 - 1255 (1976)
2. Shome, B. et al, J. Clin. Endocr. Metab.,39 199-202 (1974)
3. Uotila, M. et al, J. Immunol. Methds, 42,11-15 (1981)
4. Acosta, A.A.M.D. and Wright, G.L., Journal of Clinical Immunoassays, 6, 41 (1983).
5. Cohen, K. L., Metabolism, 26 1165-1177 (1977)
6. Lindstedt ScandJ Clin Lab Invest 42 201 (1982)
7. Chien J. Clin. Endocr. Metab. 64.313 (1987)

Ed. 01/2015

DCM014-12

DiaMetra S.r.l. Headquater: Via Calabria 15
20090 SEGRATE (MI) Italy

Tel. +39-02-2139184

Fax +39-02-2133354

Manufactory: Via Pozzuolo 14,
06038 SPELLO (PG) Italy

Tel. +39-0742-24851

Fax +39-0742-316197

E-mail: info@diametra.com



DCM014-12
Ed. 01/2015

b-HCG ELISA

for routine analysis

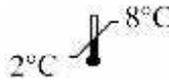
Direct immunoenzymatic determination of β -HCG in human serum or plasma

IVD



LOT

See external label



$\Sigma = 96$ tests

REF DKO014

INTENDED USE

Immunoenzymatic colorimetric method for quantitative determination of β -HCG concentration in human serum or plasma.

β -HCG ELISA kit is intended for laboratory use only.

1. CLINICAL SIGNIFICANCE

Human chorionic gonadotropin (HCG) is a glycoprotein hormone secreted in pregnancy, that is made by the embryo soon after conception and later by the syncytiotrophoblast (part of the placenta). Its role is to prevent the disintegration of the corpus luteum of the ovary and thereby maintain progesterone production that is critical for a pregnancy in humans. HCG may have additional functions, for instance it is thought that it affects the immune tolerance of the pregnancy.

Pregnancy tests measure the levels of HCG in the blood or urine to indicate the presence or absence of an implanted embryo. In particular, pregnancy tests employ an antibody that is specific to the β -subunit of HCG (β -HCG). This is important so that tests do not make false positives by confusing HCG with LH and FSH.

β -HCG is also secreted by some cancers including teratomas and choriocarcinomas. But, elevated levels cannot prove the presence of a tumor, and low levels do not rule it out.

2. PRINCIPLE

Diametra ELISA test for β -HCG is based on the simultaneous capture of HCG by a monoclonal antibody immobilized on the microplate and directed against the β -HCG fraction, and another monoclonal antibody conjugated with peroxidase horseradish (HRP) and directed against the fraction α -HCG.

After the incubation, the bound/free separation is performed by a simple solid-phase washing.

The enzyme HRP in the bound-fraction reacts with the Substrate (H_2O_2) and the TMB Substrate and develops a blue color that changes into yellow when the Stop Solution (H_2SO_4) is added.

The color intensity is proportional to the β -HCG concentration in the sample.

The β -HCG concentration in the sample is calculated based on a calibration curve.

3. REAGENTS, MATERIALS AND INSTRUMENTATION

3.1. Reagents and materials supplied in the kit

1. Calibrators (6 vials, 1 mL each)

CAL0	REF DCE002/1406-0
CAL1	REF DCE002/1407-0
CAL2	REF DCE002/1408-0
CAL3	REF DCE002/1409-0
CAL4	REF DCE002/1410-0
CAL5	REF DCE002/1411-0

2. Control (1 vial, 1 mL)

Concentration of Control is indicated on the Certificate of Analysis

REF DCE045/1403-0

3. Incubation Buffer (1 vial, 50 mL)

Phosphate buffer 50 mM pH 7.4, BSA 1 g/L

REF DCE001/1401-0

4. Conjugate (1 vial, 1 mL)

Monoclonal antibody direct against α -HCG subunit conjugated with horseradish peroxidase (HRP)

REF DCE002/1402-0

5. Coated Microplate (1 breakable microplate)

Monoclonal antibody direct against β -HCG subunit adsorbed on microplate

REF DCE002/1403-0

6. TMB Substrate (1 vial, 15 mL)

H_2O_2 -TMB (0.26 g/L) (avoid any skin contact)

REF DCE004-0

7. Stop Solution (1 vial, 15 mL)

Sulphuric acid 0.15 mol/L (avoid any skin contact)

REF DCE005-0

8. 50X Conc. Wash Solution (1 vial, 20 mL)

NaCl 45 g/L, Tween-20 55 g/L

REF DCE006-0

3.2. Reagents necessary not supplied

Distilled water.

3.3. Auxiliary materials and instrumentation

Automatic dispenser.

Microplates reader (450 nm, 620-630 nm)

Note

Store all reagents between 2-8°C in the dark.
 Open the bag of reagent 5 (Coated Microplate) only when it is at room temperature and close it immediately after use; once opened, it is stable until expiry date of the kit. Do not remove the adhesive sheets on the strips unutilised.

4. WARNINGS

- This kit is intended for in vitro use by professional persons only. Not for internal or external use in Humans or Animals.
- Use appropriate personal protective equipment while working with the reagents provided.
- Follow Good Laboratory Practice (GLP) for handling blood products.
- Some reagents contain small amounts of Proclin 300^R as preservative. Avoid the contact with skin or mucosa.
- The TMB Substrate contains an irritant, which may be harmful if inhaled, ingested or absorbed through the skin. To prevent injury, avoid inhalation, ingestion or contact with skin and eyes.
- The Stop Solution consists of a diluted sulphuric acid solution. Sulphuric acid is poisonous and corrosive and can be toxic if ingested. To prevent chemical burns, avoid contact with skin and eyes.
- Avoid the exposure of reagent TMB/H₂O₂ to directed sunlight, metals or oxidants. Do not freeze the solution.
- This method allows the determination of β-HCG from 1 to 400 mIU/mL.

5. PRECAUTIONS

- Please adhere strictly to the sequence of pipetting steps provided in this protocol. The performance data represented here were obtained using specific reagents listed in this Instruction For Use.
- All reagents should be stored refrigerated at 2-8°C in their original container. Any exceptions are clearly indicated. The reagents are stable until the expiry date when stored and handled as indicated.
- Allow all kit components and specimens to reach room temperature (22-28°C) and mix well prior to use.
- Do not interchange kit components from different lots. The expiry date printed on box and vials labels must be observed. Do not use any kit component beyond their expiry date.
- If you use automated equipment, the user has the responsibility to make sure that the kit has been appropriately tested.
- The incomplete or inaccurate liquid removal from the wells could influence the assay precision and/or increase the background. To improve the performance of the kit on automatic systems is recommended to increase the number of washes.
- It is important that the time of reaction in each well is held constant for reproducible results. Pipetting of samples should not extend beyond ten minutes to avoid assay drift. If more than 10 minutes are needed, follow the same order of

dispensation. If more than one plate is used, it is recommended to repeat the dose response curve in each plate

- Addition of the TMB Substrate solution initiates a kinetic reaction, which is terminated by the addition of the Stop Solution. Therefore, the TMB Substrate and the Stop Solution should be added in the same sequence to eliminate any time deviation during the reaction.
- Observe the guidelines for performing quality control in medical laboratories by assaying controls and/or pooled sera.
- Maximum precision is required for reconstitution and dispensation of the reagents.
- Samples microbiologically contaminated, highly lipemic or haemolysed should not be used in the assay.
- Plate readers measure vertically. Do not touch the bottom of the wells.

6. PROCEDURE**6.1. Preparation of the Calibrators (C₀...C₅)**

The Calibrators are ready to use, are calibrated against the WHO 1st IRP 75/537 and have the following concentrations:

	C ₀	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅
mIU/mL	0	1	5	20	100	400

The Calibrators are stable until the expiry date printed on the label. Once opened, the calibrators are stable six months at 2-8°C.

6.2. Preparation of Wash Solution

Dilute the content of each vial of the "50X Conc. Wash Solution" with distilled water to a final volume of 1000 mL prior to use. For smaller volumes respect the 1:50 dilution ratio. The diluted wash solution is stable for 30 days at 2-8°C.

6.3. Preparation of Diluted Conjugate

Prepare immediately before use.
 Add 10 µL conjugate (reagent 4) to 1.0 mL of Incubation Buffer (reagent 3). The quantity of diluted Conjugate is proportional at the number of tests.
 Mix gently for 10 minutes with a rotating mixer. Stable for 3 hours at room temperature (22-28°C).

6.4. Preparation of the Sample

-HCG determination should be done in human serum or plasma.
 Specimen can be stored at 2-8°C for at short time (max two days). For longer storage the specimen should be frozen at -20°C. Avoid repeated freezing and thawing.
 For sample with concentration over 400 mIU/mL dilute the sample with Incubation buffer.
 The Control is ready to use.

6.5. Procedure

- **Allow all reagents to reach room temperature (22-28°C) for at least 30 minutes.** At the end of the assay, store immediately the reagents at 2-8°C: avoid long exposure to room temperature.
- Unused coated microwell strips should be released securely in the foil pouch containing desiccant and stored at 2-8°C.
- To avoid potential microbial and/or chemical contamination, unused reagents should never be transferred into the original vials.
- As it is necessary to perform the determination in duplicate in order to improve accuracy of the test results, prepare two wells for each point of the calibration curve (C₀-C₅), two for each Control, two for each sample, one for Blank.

Reagent	Calibrator	Sample/Control	Blank
Calibrator C ₀ -C ₅	25 µL		
Sample/Control		25 µL	
Diluted Conjugate	100 µL	100 µL	
Incubate at room temperature (22÷28°C) for 1 hour. Remove the contents from each well; wash the wells 3 times with 300 µL of diluted Wash Solution Important note: during each washing step, gently shake the plate for 5 seconds and remove excess solution by tapping the inverted plate on an absorbent paper towel. Automatic washer: if you use automated equipment, wash the wells at least 5 times.			
TMB Substrate	100 µL	100 µL	100 µL
Incubate at room temperature (22÷28°C) for 15 minutes in the dark.			
Stop Solution	100 µL	100 µL	100 µL
Shake the microplate gently. Read the absorbance (E) at 450 nm against a reference wavelength of 620-630 nm or against Blank within 5 minutes.			

7. QUALITY CONTROL

Each laboratory should assay controls at normal, high and low levels range of β -HCG for monitoring assay performance. These controls should be treated as unknowns and values determined in every test procedure performed. Quality control charts should be maintained to follow the performance of the supplied reagents. Pertinent statistical methods should be employed to ascertain trends. The individual laboratory should set acceptable assay performance limits. In addition, maximum absorbance should be consistent with past experience. Significant deviation from established performance can indicate unnoticed change in experimental conditions or degradation of kit reagents. Fresh reagents should be used to determine the reason for the variations.

8. RESULTS

8.1. Mean Absorbance

Calculate the mean of the absorbance (E_m) for each point of the calibration curve (C₀-C₅) and of each sample.

8.2. Calibration curve

Plot the values of absorbance (E_m) of the calibrators (C₀-C₅) against concentration. Draw the best-fit curve through the plotted points (es: Four Parameter Logistic o Sigmoide).

8.3. Calculation of Results

Interpolate the values of the samples on the calibration curve to obtain the corresponding values of the concentrations expressed in mIU/mL.

9. REFERENCE VALUES

Each laboratory must establish its own normal ranges based on patient population.

The serum β -HCG reference values are:

	Range (mIU/mL)
Normal women	< 8.0
Pregnancy:	
1° week	3.0 - 100
2° week	10 - 1000
3° week	100 - 10000
4° week	1000 - 100000
2° month	15000 - 200000
3° month	10000 - 100000

Please pay attention to the fact that the determination of a range of expected values for a "normal" population in a given method is dependent on many factors, such as specificity and sensitivity of the method used and type of population under investigation. Therefore each laboratory should consider the range given by the Manufacturer as a general indication and produce their own range of expected values based on the indigenous population where the laboratory works.

10. PERFORMANCE AND CHARACTERISTICS

10.1. Precision

10.1.1. Intra Assay Variation

Within run variation was determined by replicate (16x) the measurement of three different control sera in one assay. The within assay variability is 7.6%.

10.1.2. Inter Assay Variation

Between run variation was determined by replicate the measurement of three different control sera in different lots. The between assay variability is 8.8%.

10.2. Accuracy

The recovery of 6.25 - 12.5 - 25 - 50 mIU/mL of β -HCG added to sample gave an average value (\pm SD) of 99.2% \pm 4.1% with reference to the original concentrations.

10.3. Specificity

Cross reactivity values of the -HCG ELISA has been calculated on a weight/weight basis:

-HCG	100 %
hFSH	3.0 %
HCG	4.0 %
hTSH	0.02%

10.4. Sensitivity

The lowest detectable concentration of -HCG that can be distinguished from the Calibrator 0 is 0.09 mIU/mL at the 95% confidence limit.

10.5. Correlation

Diametra -HCG ELISA (y) was compared to another commercially available -HCG assay (x). Serum samples of 49 females were analysed according to both test systems.

The linear regression curve was calculated

$$y = 0.94 x - 0.02$$

$$r = 0.96 (r^2 = 0.92)$$

10.6. Hook Effect

-HCG ELISA, a competitive enzyme immunoassay, shows no Hook Effect up to 250.000 mIU/mL.

11. WASTE MANAGEMENT

Reagents must be disposed off in accordance with local regulations.

BIBLIOGRAPHY

1. Wisdom, G.B. Clin. Chem. 22/8 1243 - 1255 (1976)
2. Shome, B. et al, J. Clin. Endocr. Metab.,39 199–202 (1974)
3. Uotila, M. et al, J. Immunol. Methds, 42,11-15 (1981)
4. Acosta, A.A.M.D. and Wright, G.L., Journal of Clinical Immunoassays, 6, 41 (1983).
5. Cohen, K. L., Metabolism, 26 1165-1177 (1977)
6. Lindstedt ScandJ Clin Lab Invest 42 201 (1982)
7. Chien J. Clin. Endocr. Metab. 64.313 (1987)

Ed. 01/2015

DCM014-12

DiaMetra S.r.l. Headquater: Via Calabria 15

20090 SEGRATE (MI) Italy

Tel. +39-02-2139184

Fax +39-02-2133354

Manufactory: Via Pozzuolo 14,

06038 SPELLO (PG) Italy

Tel. +39-0742-24851

Fax +39-0742-316197

E-mail: info@diametra.com



DCM014-12
Ed. 01/2015

b-HCG ELISA

para análisis de rutina

Determinación inmunoenzimática directa de β -HCG en suero o plasma humano

IVD



LOT

ver etiqueta externa



$\Sigma = 96$ ensayos

REF DKO014

USO PREVISTO

Método inmunoenzimático colorimétrico para la determinación cuantitativa de la concentración de β -HCG en suero o plasma humano.

El kit b-HCG ELISA está destinado al uso en laboratorio exclusivamente.

1. SIGNIFICADO CLÍNICO

La hCG es una hormona glicoproteica secretada durante el embarazo, sintetizada por el embrión justo después de la concepción y posteriormente por la placenta. Su función consiste en evitar la desintegración del cuerpo lúteo del ovario y promover así la síntesis de la progesterona, que es una condición esencial para el embarazo en los seres humanos. La hCG tiene otras funciones, como por ejemplo, está involucrada en la inmunotolerancia del embarazo.

La comprobación, durante el embarazo, de los niveles de hCG en sangre o en la orina indica la presencia o ausencia de un embrión implantado. En particular, las pruebas de embarazo emplean un anticuerpo que es específico de la unidad de hCG (β -hCG). Esto es importante para que las pruebas no generen falsos positivos con LH y FSH.

La β -hCG es secretada por algunas células cancerosas como, por ejemplo, el teratoma y el coriocarcinoma. Pero los niveles altos no pueden demostrar la presencia de un tumor y los niveles bajos no lo excluyen.

2. PRINCIPIO DEL MÉTODO

La prueba Diametra ELISA para β -HCG se basa en la captura simultánea de HCG por un anticuerpo monoclonal dirigido contra la fracción de la β -HCG inmovilizado en la microplaca y otro anticuerpo monoclonal dirigido contra la fracción de α -HCG conjugado con peroxidasa de rábano (HRP).

Después de la incubación, la separación de las fracciones libre y unida se obtiene mediante un simple lavado de la fase sólida.

La enzima HRP presente en la fracción unida cataliza la reacción entre el sustrato (H_2O_2) y el sustrato TMB, desarrollando una coloración azul que cambia a amarillo tras la adición de la solución de parada (H_2SO_4).

La intensidad del color desarrollado es proporcional a la concentración de β -hCG presente en la muestra.

La concentración de la β -hCG en la muestra se calcula tomando como base una curva de calibración.

3. REACTIVOS, MATERIALES E INSTRUMENTACIÓN

3.1. Reactivos y materiales suministrados en el kit

1. Calibradores (6 frascos, 1 mL cada uno)

CAL0

REF DCE002/1406-0

CAL1

REF DCE002/1407-0

CAL2

REF DCE002/1408-0

CAL3

REF DCE002/1409-0

CAL4

REF DCE002/1410-0

CAL5

REF DCE002/1411-0

2. Control (1 frasco, 1 mL)

La concentración del Control se indica en el Certificado de Análisis

REF DCE045/1403-0

3. Tampón de incubación (1 frasco, 50 mL)

Tampón fosfato 50 mM pH 7,4; BSA 1 g/L

REF DCE001/1401-0

4. Conjugado (1 frasco, 1 mL)

Anticuerpo monoclonal dirigido contra la subunidad α -HCG conjugado con peroxidasa de rábano (HRP)

REF DCE002/1402-0

5. Microplaca recubierta (1 microplaca rompible)

Anticuerpo monoclonal dirigido contra la subunidad β -HCG absorbido en la microplaca

REF DCE002/1403-0

6. Sustrato TMB (1 frasco, 15 mL)

H_2O_2 -TMB (0,26 g/L) (evitar el contacto con la piel)

REF DCE004-0

7. Solución de parada (1 frasco, 15 mL)

Ácido sulfúrico 0,15 mol/L (evitar el contacto con la piel)

REF DCE005-0

8. Solución de lavado conc. 50X (1 frasco, 20 mL)

NaCl 45 g/L, Tween-20 55 g/L

REF DCE006-0

3.2. Reactivos necesarios no suministrados en el kit

Agua destilada.

3.3. Material e instrumentación auxiliares

Dispensadores automáticos.

Lector de microplacas (450 nm, 620-630 nm)

Nota

Conservar todos los reactivos a 20^o8°C, protegidos de la luz.

Abrir la bolsa del reactivo 5 (microplaca recubierta) solo cuando se encuentre a temperatura ambiente y cerrarla inmediatamente después de extraer las tiras que se vayan a utilizar; una vez abierta, permanece estable hasta la fecha de caducidad del kit.

No retirar las hojas adhesivas de las tiras que no se vayan a usar en la sesión de análisis.

4. ADVERTENCIAS

- Este kit de ensayo está previsto para usarse in vitro y por personal experto. No es para uso interno o externo en humanos o animales.
- Usar los equipos de protección individual previstos al trabajar con los reactivos suministrados.
- Siga las Buenas Prácticas de Laboratorio (GLP) en el manejo de las muestras sanguíneas y sus derivados.
- Algunos reactivos contienen pequeñas cantidades de Proclín 300^R como conservante. Evite el contacto con la piel y las mucosas.
- El cromógeno TMB contiene un irritante que puede ser dañino si se inhala, se ingiere o se absorbe a través de la piel. Para prevenir lesiones, evitar la inhalación, la ingestión o el contacto con la piel y con los ojos.
- La solución de parada está formada por una solución de ácido sulfúrico diluido. El ácido sulfúrico es venenoso y corrosivo, y puede ser tóxico si se ingiere. Para prevenir posibles quemaduras químicas, evitar el contacto con la piel y con los ojos.
- Evite la exposición de los reactivos TMB/H₂O₂ a la luz solar directa, metales u oxidantes. No congelar la solución.
- Este método permite determinar concentraciones de β-HCG de 1 mIU/mL a 400 mIU/mL.

5. PRECAUCIONES

- Respetar rigurosamente la secuencia de los pasos indicados en este protocolo. Los resultados aquí presentados se han obtenido utilizando los reactivos específicos que figuran en estas instrucciones de uso.
- Todos los reactivos deben conservarse a una temperatura controlada de 2-8 °C en sus recipientes originales. Todas las excepciones están claramente marcados. Los reactivos son estables hasta la fecha de caducidad cuando se almacenan y manipulan de acuerdo con las instrucciones proporcionadas.
- Antes del uso, esperar hasta que todos los componentes del kit y las muestras se encuentren a temperatura ambiente (22-28°C) y mezclar cuidadosamente.
- No mezclar componentes de kits de lotes distintos. Se debe observar la fecha de caducidad indicada en la etiqueta de la caja y de todas las ampollas. No usar componentes después de la fecha de caducidad.

- Si utiliza un equipo automático, es responsabilidad del usuario asegurar que la metodología aplicada haya sido debidamente validada.
- Un lavado incompleto o impreciso y la aspiración insuficiente del líquido de los pocillos ELISA pueden causar una precisión pobre y/o un elevado fondo. Para mejorar el rendimiento del kit en los sistemas automatizados, se recomienda aumentar el número de lavados.
- Para la reproducibilidad de los resultados, es importante que el tiempo de reacción sea igual para cada pocillo. El tiempo de dispensación de los pocillos no debe superar los 10 minutos; si se prolongara más allá de los 10 minutos, respétese el orden de dispensación. Si utiliza más de una placa, se recomienda repetir la curva de calibración en cada plato.
- Al añadir el sustrato TMB inicia una reacción cinética que termina al agregar la solución de parada. Tanto el sustrato como la solución de parada deben agregarse en la misma secuencia para evitar diferentes tiempos de reacción.
- Observar las directrices para la ejecución del control de calidad en los laboratorios clínicos al comprobar controles y/o pool de sueros.
- Observar la máxima precisión en la reconstitución y dispensación de los reactivos.
- No use muestras con contaminación microbiana, altamente lipémicas o hemolizadas.
- Los lectores de microplacas leen las DO verticalmente, por tanto no debe tocarse el fondo de los pocillos.

6. PROCEDIMIENTO

6.1. Preparación de los Calibradores (C₀...C₅)

Los Calibradores son listo para usar, son calibrados frente a WHO 1^a IRP 75/537, y tienen las siguientes concentraciones:

	C ₀	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅
mIU/mL	0	1	5	20	100	400

Los Calibradores son estables hasta la fecha de caducidad impresa en la etiqueta. Una vez abiertos, los Calibradores permanecen estables al menos 6 meses a 2-8°C.

6.2. Preparación de la solución de lavado

Antes del uso, diluir el contenido de cada ampolla de "Solución de lavado conc. 50X" con agua destilada hasta un volumen de 1000 mL. Para preparar volúmenes menores, respetar la relación de dilución de 1:50. La solución de lavado diluida se mantiene estable a 2-8°C durante al menos 30 días.

6.3. Preparación del conjugado diluido

Preparar inmediatamente antes del uso.

Añadir 10 µL de conjugado (reactivo 4) a 1 mL de tampón de incubación (reactivo 3). La cantidad de conjugado que se debe preparar es proporcional al número de ensayos.

Mezclar con cuidado dejando al menos 10 minutos en el agitador giratorio. Estable durante al menos 3 horas a temperatura ambiente (22-28 °C).

6.4. Preparación de la muestra

La determinación de la β -hCG se realiza en suero o plasma humano. Si la dosificación no se realiza en un plazo de dos días desde la extracción, conservar la muestra a -20°C . No volver a congelar las muestras una vez descongeladas.

Para muestras con una concentración superior a 400 mIU/mL, diluir la muestra con tampón de incubación.

El Control está listo para usar.

6.5. Procedimiento

- **Esperar hasta que todos los reactivos se encuentren a temperatura ambiente ($22-28^{\circ}\text{C}$) durante al menos 30 minutos.** Al final del ensayo inmediatamente poner todos los reactivos a $2-8^{\circ}\text{C}$ para evitar largos periodos a temperatura ambiente.
- Las tiras de pocillos no utilizados se deben guardar de inmediato en la bolsa desechable que contiene desecantes y almacenarse a $2-8^{\circ}\text{C}$.
- Para evitar la contaminación microbiana y/o química no regrese porciones de reactivos no usados en los viales originales.
- Para aumentar la precisión de los resultados de la prueba es necesario trabajar en duplicado: preparar dos pocillos para cada punto de la curva de calibración (C_0-C_5), dos para cada control, dos para cada muestra, uno para el blanco.

7. CONTROL DE CALIDAD

Cada laboratorio debe analizar sueros control para los rangos bajo, medio y alto de β -hCG para supervisar el rendimiento del análisis. Estas muestras deben tratarse como desconocidas y los valores deben determinarse en cada ensayo realizado. Se deben mantener los gráficos de control de calidad para seguir el rendimiento de los reactivos suministrados. Se deben emplear métodos estadísticos adecuados para determinar las tendencias. El laboratorio debe establecer los límites de aceptabilidad del rendimiento del análisis. Además, la capacidad de absorción máxima debe ser constante con la experiencia anterior. Una desviación significativa del rendimiento establecido puede indicar un cambio inadvertido en las condiciones experimentales o la degradación de los reactivos del kit. Se deben usar reactivos frescos para determinar la causa de las variaciones.

8. RESULTADOS

8.1. Absorbancia media

Calcular la absorbancia media (E_m) de cada punto de la curva de calibración (C_0-C_5) y de cada muestra.

8.2. Curva de calibración

Trazar el gráfico de la absorbancia (E_m) en función de las concentraciones de los Calibradores (C_0-C_5) (p. ej.: logística de cuatro parámetros o sigmoideo).

8.3. Cálculo de los resultados

Interpolar del gráfico los valores de absorbancia relativos a cada muestra y leer la concentración correspondiente en mIU/mL.

9. VALORES DE REFERENCIA

Cada laboratorio debe establecer su propio rango basándose en la población de los pacientes.

Los valores séricos de β HCG se incluyen en los siguientes intervalos:

	Valores (mIU/mL)
Mujeres normales	< 8.0
Embarazo:	
1° settimana	3.0 - 100
2° settimana	10 - 1000
3° settimana	100 - 10000
4° settimana	1000 - 100000
2° mese	15000 - 200000
3° mese	10000 - 100000

Es importante señalar que la determinación de un rango de valores esperados en un método dado para una población "normal" depende de muchos factores, tales como la especificidad y sensibilidad del método en uso, y la población en estudio. Por lo tanto, cada laboratorio debe considerar el intervalo especificado por el fabricante como una guía general y producir su propio rango de valores calculados en base al estadístico obtenido por el laboratorio, donde reside la población local.

Reactivo	Calibrador	Muestra /Control	Blanco
Calibrador C_0-C_5	25 μL		
Muestra /Control		25 μL	
Conjugado diluido	100 μL	100 μL	
<p>Incubar 1 h a temperatura ambiente ($22\pm 28^{\circ}\text{C}$). Retirar la mezcla de reacción, lavar 3 veces añadiendo a cada pocillo 0,3 mL de solución de lavado diluida.</p> <p>Nota importante: agite suavemente la placa durante 5 segundos en cada paso del lavado. Después del último lavado asegúrese haber eliminado completamente la solución de lavado de los pozos, invierta la placa y golpéela repetidas veces contra una servilleta de papel absorbente.</p> <p>Lavados automático: si está utilizando una lavadora automática, lavar los pocillos al menos 5 veces.</p>			
Substrato TMB	100 μL	100 μL	100 μL
<p>Incubar 15 minutos a temperatura ambiente ($22\pm 28^{\circ}\text{C}$), protegida de la luz.</p>			
Solución de parada	100 μL	100 μL	100 μL
<p>Agitar la microplaca con cuidado. Leer la absorbancia (E) a 450 nm frente una segunda lectura de referencia a 620-630 nm o frente al blanco entre 5 minutos.</p>			

10.1. Precisión

10.1.1. Intraensayo

La variabilidad dentro del mismo kit se ha determinado replicando (16x) la determinación de tres sueros de control distintos. La variabilidad intraensayo es 7,6%.

10.1.2. Interensayo

La variabilidad entre distintos kits se ha determinado replicando la determinación de tres sueros de control distintos con kits pertenecientes a lotes distintos. La variabilidad interensayo es 8,8%.

10.2. Exactitud

La prueba de recuperación realizada en una muestra enriquecida con 6,25 - 12,5 - 25 - 50 mIU/mL de β-hCG ha dado un valor medio (±SD) de 99,2% ± 4,1%.

10.3. Especificidad

La reactividad cruzada del kit -hCG ELISA se calculó basándose en las relaciones de masa:

β-hCG	100%
hFSH	3,0%
hCG	4,0%
hTSH	0,02%

10.4. Sensibilidad

La concentración mínima de β-hCG medible que puede distinguirse del Calibrador 0 es de 0,09 mIU/mL con un límite de confianza del 95%.

10.5. Correlación con la dosis RIA

El kit β-hCG (Diametra) se ha comparado con un kit disponible en el mercado. Se han comprobado muestras de suero de 49 mujeres.

La curva de regresión es:

y = 0,94 x - 0,02

r = 0,96 (r² = 0,92)

10.6. Efecto gancho

En este método no se ha observado efecto gancho hasta 250.000 mIU/mL.

11. DISPOSICIONES PARA LA ELIMINACIÓN

Los reactivos deben eliminarse de acuerdo con las leyes locales.

DiaMetra S.r.l. Headquarter: Via Calabria 15, 20090 SEGRATE (MI) Italy
Tel. +39-02-2139184
Fax +39-02-2133354
Manufactory: Via Pozzuolo 14, 06038 SPELLO (PG) Italy
Tel. +39-0742-24851
Fax +39-0742-316197
E-mail: info@diametra.com

BIBLIOGRAFÍA

1. Wisdom, G.B. Clin. Chem. 22/8 1243 - 1255 (1976)
2. Shome, B. et al, J. Clin. Endocr. Metab.,39 199-202 (1974)
3. Uotila, M. et al, J. Immunol. Methds, 42,11-15 (1981)
4. Acosta, A.A.M.D. and Wright, G.L., Journal of Clinical Immunoassays, 6, 41 (1983).
5. Cohen, K. L., Metabolism, 26 1165-1177 (1977)
6. Lindstedt ScandJ Clin Lab Invest 42 201 (1982)
7. Chien J. Clin. Endocr. Metab. 64.313 (1987)

	DE ES FR GB IT PT	In vitro Diagnostikum Producto sanitario para diagnóstico In vitro Dispositif medical de diagnostic in vitro In vitro Diagnostic Medical Device Dispositivo medico-diagnostico in vitro Dispositivos medicos de diagnostico in vitro		DE ES FR GB IT PT	Hergestellt von Elaborado por Fabriqué par Manufacturer Produttore Produzido por
	DE ES FR GB IT PT	Achtung, Begleitdokumente Precaución, consulte los documentos adjuntos Attention, veuillez consulter les documents d'accompagnement Caution, consult accompanying documents Attenzione, consultare la documentazione allegata Atenção, consultar os documentos de acompanhamento	 yyyy-mm	DE ES FR GB IT PT	Herstellungs datum Fecha de fabricacion Date de fabrication Date of manufacture Data di produzione Data de produção
 yyyy-mm-dd	DE ES FR GB IT PT	Verwendbar bis Establa hasta (usar antes de último día del mes) Utiliser avant (dernier jour du mois indiqué) Use by (last day of the month) Utilizzare prima del (ultimo giorno del mese) Utilizar (antes ultimo dia do mês)		DE ES FR GB IT PT	Biogefährdung Riesco biológico Risque biologique Biological risk Rischio biologico Risco biológico
	DE ES FR GB IT PT	Gebrauchsanweisung beachten Consultar las instrucciones Consulter le mode d'emploi Consult instructions for use Consultare le istruzioni per l'uso Consultar instruções para uso	LOT	DE ES FR GB IT PT	Chargenbezeichnung Codigo de lote Numero de lot Batch code Codice del lotto Codigo do lote
 $\Sigma = xx$	DE ES FR GB IT PT	Ausreichend für "n" Tests Contenido suficiente para "n" tests Contenu suffisant pour "n" tests Contains sufficient for "n" tests Contenuto sufficiente per "n" saggi Contém o suficiente para "n" testes	CONT	DE ES FR GB IT PT	Inhalt Contenido del estuche Contenu du coffret Contents of kit Contenuto del kit Conteúdo do kit
 Max Min	DE ES FR GB IT PT	Temperaturbereich Límitación de temperatura Limites de température de conservation Temperature limitation Limiti di temperatura Temperaturas limites de conservação	REF	DE ES FR GB IT PT	Bestellnummer Número de catálogo Références du catalogue Catalogue number Numero di Catalogo Número do catálogo
	DE ES FR GB IT PT	Vor direkter Sonneneinstrahlung schützen Mantener alejado de la luz solar Tenir à l'écart de la lumière du soleil Keep away from sunlight Tenere lontano dalla luce solare Mantenha longe da luz solar			

SUGGERIMENTI PER LA RISOLUZIONE DEI PROBLEMI/TROUBLESHOOTING**ERRORE CAUSE POSSIBILI/ SUGGERIMENTI****Nessuna reazione colorimetrica del saggio**

- mancata dispensazione del coniugato
- contaminazione del coniugato e/o del Substrato
- errori nell'esecuzione del saggio (es. Dispensazione accidentale dei reagenti in sequenza errata o provenienti da flaconi sbagliati, etc.)

Reazione troppo blanda (OD troppo basse)

- coniugato non idoneo (es. non proveniente dal kit originale)
- tempo di incubazione troppo breve, temperatura di incubazione troppa bassa

Reazione troppo intensa (OD troppo alte)

- coniugato non idoneo (es. non proveniente dal kit originale)
- tempo di incubazione troppo lungo, temperatura di incubazione troppa alta
- qualità scadente dell'acqua usata per la soluzione di lavaggio (basso grado di deionizzazione,)
- lavaggi insufficienti (coniugato non completamente rimosso)

Valori inspiegabilmente fuori scala

- contaminazione di pipette, puntali o contenitori- lavaggi insufficienti (coniugato non completamente rimosso)

CV% intrasaggio elevato

- reagenti e/o strip non portate a temperatura ambiente prima dell'uso
- il lavatore per micropiastre non lava correttamente (suggerimento: pulire la testa del lavatore)

CV% intersaggio elevato

- condizioni di incubazione non costanti (tempo o temperatura)
- controlli e campioni non dispensati allo stesso tempo (con gli stessi intervalli) (controllare la sequenza di dispensazione)
- variabilità intrinseca degli operatori

ERROR POSSIBLE CAUSES / SUGGESTIONS**No colorimetric reaction**

- no conjugate pipetted reaction after addition
- contamination of conjugates and/or of substrate
- errors in performing the assay procedure (e.g. accidental pipetting of reagents in a wrong sequence or from the wrong vial, etc.)

Too low reaction (too low ODs)

- incorrect conjugate (e.g. not from original kit)
- incubation time too short, incubation temperature too low

Too high reaction (too high ODs)

- incorrect conjugate (e.g. not from original kit)
- incubation time too long, incubation temperature too high
- water quality for wash buffer insufficient (low grade of deionization)
- insufficient washing (conjugates not properly removed)

Unexplainable outliers

- contamination of pipettes, tips or containers
- insufficient washing (conjugates not properly removed) too high within-run
- reagents and/or strips not pre-warmed to CV% Room Temperature prior to use
- plate washer is not washing correctly (suggestion: clean washer head)
- too high between-run - incubation conditions not constant (time, CV % temperature)
- controls and samples not dispensed at the same time (with the same intervals) (check pipetting order)
- person-related variation

ERROR / POSIBLES CAUSAS / SUGERENCIAS**No se produce ninguna reacción colorimétrica del ensayo**

- no se ha dispensado el conjugado
- contaminación del conjugado y/o del sustrato
- errores en la ejecución del ensayo (p. ej., dispensación accidental de los reactivos en orden incorrecto o procedentes de frascos equivocados, etc.)

Reacción escasa (DO demasiado bajas)

- conjugado no idóneo (p. ej., no procedente del kit original)
- tiempo de incubación demasiado corto, temperatura de incubación demasiado baja

Reacción demasiado intensa (DO demasiado altas)

- conjugado no idóneo (p. ej., no procedente del kit original)
- tiempo de incubación demasiado largo, temperatura de incubación demasiado alta
- calidad escasa del agua usada para la solución de lavado (bajo grado de desionización)
- lavados insuficientes (el conjugado no se ha retirado completamente)

Valores inexplicablemente fuera de escala

- contaminación de pipetas, puntas o contenedores- lavados insuficientes (el conjugado no se ha retirado completamente)

CV% intraensayo elevado

- los reactivos y/o tiras no se encontraban a temperatura ambiente antes del uso
- el lavador de microplacas no funciona correctamente (sugerencia: limpiar el cabezal del lavador)

CV% interensayo elevado

- condiciones de incubación no constantes (tiempo o temperatura)
- controles y muestras no dispensados al mismo tiempo (con los mismos intervalos) (controlar la secuencia de dispensación)
- variación en función de los operadores

ERREUR CAUSES POSSIBLES / SUGGESTIONS**Aucune réaction colorimétrique de l'essai**

- non distribution du conjugué
- contamination du conjugué et/ou du substrat
- erreurs dans l'exécution du dosage (par ex., distribution accidentelle des réactifs dans le mauvais ordre ou en provenance des mauvais flacons, etc.)

Réaction trop faible (DO trop basse)

- conjugué non approprié (par ex., ne provenant pas du coffret original)
- temps d'incubation trop court, température d'incubation trop basse

Réaction trop intense (DO trop élevée)

- conjugué non approprié (par ex., ne provenant pas du coffret original)
- temps d'incubation trop long, température d'incubation trop élevée
- mauvaise qualité de l'eau utilisée pour la solution de lavage (bas degré de déionisation)
- lavages insuffisants (conjugué non entièrement éliminé)

Valeurs inexplicablement hors plage

- contamination des pipettes, embouts ou récipients - lavages insuffisants (conjugué non entièrement éliminé)

CV% intra-essai élevé

- les réactifs et/ou les bandes n'ont pas atteint la température ambiante avant usage
- le laveur de microplaques ne lave pas correctement (suggestion : nettoyer la tête du laveur)

CV% inter-essai élevé

- conditions d'incubation non constantes (temps ou température)
- contrôles et échantillons non distribués en même temps (avec les mêmes intervalles) (contrôler l'ordre de distribution)
- variabilité intrinsèque des opérateurs